

Tiia Hermunen

# CD49d-ilmentymä kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko, AMK

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

20.4.2016

Tekijä(t) Otsikko	Tiia Hermunen CD49d-ilmentymä kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa
Sivumäärä Aika	32 sivua + 2 liitettä 20.04.2017
Tutkinto	Bioanalyttikko, AMK
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori, Heidi Malava Erikoislääkäri, Sanna Siitonen
<p>Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratorioden Meilahden sairaalan laboratorion virtaussytometrian yksikössä on alustavasti otettu CD49d osaksi kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavien potilaiden erotusdiagnostista lymfoproliferaalisten tautien diagnostista paneelia. CD49d-proteiini ilmenee vaihtelevasti kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa. Tutkimuksissa on havaittu, että raja-arvon ylittävä klonaalisten B-solujen CD49d-ilmentymien viittaisi potilaiden huonoon ennusteeseen. Tällöin CD49d-positiivisilla kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavilla on lyhyempi hoitamaton aika ja elinaika kuin potilailla, joiden CD49d-ilmentymien katsotaan negatiiviseksi. Opinnäytetyössä pyrittiin selvittämään, onko CD49d-ilmentymää mahdollista käyttää erotusdiagnostiikassa apuna potilaiden ennusteen arvioinnissa.</p> <p>Tutkimusaineisto kerättiin harkinnanvaraisena otoksena toimeksiantajan antamien kriteerien mukaisesti. Se koostui 106 potilasnäytteestä, joista verinäytteitä oli 75 ja luuydinäytteitä 31. Näyteaineistoa käsiteltiin SPSS-tilasto-ohjelmalla ja tarkasteltiin kuvailevien tunnuslukujen avulla. Opinnäytetyössä verrattiin korrelaatiokertoimien avulla arkistoitujen, virtaussytometrisesti diagnosoitujen kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavien potilaiden näytteiden klonaalisten B-solujen CD49d-ilmentymiä verenkuvatietoihin, taudin syto- ja molekyylogeneetiikkaan sekä hoitotietoihin.</p> <p>Opinnäytetyössä tehdyn tutkimuksen mukaan on mahdollista, että CD49d-ilmentymä ei toimitisi kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavien potilaiden ennusteen arvioinnissa. Merkittävää korrelaatiota ei parametrien välillä ollut havaittavissa, vaikka riippuvuutta löytyikin. Tutkimuksen perusteella ei voida sanoa tarkasti onko CD49d-ilmentymällä vaikutusta kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavien potilaiden hoito- ja eliniän ennusteeseen. Tutkimustulokset ovat suuntaa-antavia, mikäli CD49d otetaan mukaan uuteen B-soluisten lymfoproliferaalisten tautien diagnostiseen paneeliin, kannattaa klonaalisten B-solujen CD49d-ilmentymän vaikutusta potilaiden ennusteeseen tutkia vielä tarkemmin. Uutta paneelia tul- laan käyttämään muun muassa kroonisen lymfaattisen leukemian erotusdiagnostiikassa ja maligniteetin asteen arvioinnissa.</p>	
Avainsanat	CD49d, virtaussytometria, immunofenotyyppitys, krooninen lymfaattinen leukemia

Author(s) Title	Tiia Hermunen CD49d Protein Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia
Number of Pages Date	32 pages + 2 appendices 20 April 2017
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Heidi Malava, Principal Lecturer Sanna Siitonen, Specialist
<p>The flow cytometry laboratory of the Meilahti Hospital, Helsinki, Finland, has provisionally taken the expression of CD49d protein as part of the lymphoproliferative disease panel which is used to differentiate patients with chronic lymphocytic leukemia among other B-cell diseases. The CD49d protein expression is variable in chronic lymphocytic leukemia, and previous studies have shown that the expression levels over cut-off value indicate the poor out of patients. The purpose of my study was to determine whether it was possible to use CD49d protein expression as a marker in separation diagnostics as a detector of chronic lymphocytic leukemia patients prognosis.</p> <p>I collected the research material using a discretionary sampling. The criteria of the sampling was set by the client, i.e. the hospital. The data consisted of 106 chronic lymphocytic leukemia patients samples of which 75 were blood samples and 31 bone marrow samples. The material was processed with the Microsoft SPSS statistics program. The research material was examined with descriptive statistics and correlation coefficients. In my study, I compared CD49d protein expression in clonal B-cells with the information on the results of blood counts, treatment data, cytogenetics and molecular genetics.</p> <p>The results of my study showed that it was possible that CD49d protein expression did not work as a solo predictor of patients poor outcome. Study showed that there was not remarkable correlation between CD49d expression in clonal B-cells and other parameters. Although it is important to note that the results cannot be said to be sure, since the results of the study are suggestive. If CD49d is taken into the new lymphoproliferative diseases diagnostic panel, it is suggestible to research further CD49d expression in clonal B-cells and its effects in patients prognosis. The new diagnostic panel is going to be used in the separating diagnostics and evaluation of the malignity of the disease, for instance.</p>	
Keywords	CD49d-protein, flow cytometry, immunophenotyping, chronic lymphocytic leukemia

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Krooninen lymfaattinen leukemia	2
2.1	Diagnosointi	5
2.2	CD49d-ilmentymä	7
2.3	Kliiniset ennusteluokitukset	8
2.3.1	Binetin luokitus	8
2.3.2	Rain muokattu luokitus	9
2.4	Hoidon aloituksen indikaatiot	10
3	Virtaussytometria	11
3.1	Virtaussytometri	11
3.2	Periaate	11
3.3	Fluorokromit	13
3.4	Immunofenotyyppitys	13
3.5	Näytelaadut	14
3.5.1	Laskimoverinäyte	14
3.5.2	Luuydinnäyte	15
4	Tutkimuksen tarkoitus, tavoite ja tutkimusongelmat	16
5	Opinnäytetyön toteutus	17
5.1	Aineisto	18
5.2	Aineiston analyysimenetelmät	19
5.3	Aineiston analysointi	20
6	Tutkimuksen tulokset	23
7	Pohdinta	25
7.1	Luotettavuuden arviointi	26
7.2	Eettisyys	27
7.3	Tulosten hyödynnettävyys	28
7.4	Prosessin arviointia	28
	Lähteet	30

## Liitteet

Liite 1. Sanasto

Liite 2. Tutkimusaineiston Pearsonin korrelaatiokertoimet

## 1 Johdanto

Krooninen lymfaattinen leukemia (KLL) on B-solu-tauti, jonka etiologia on tuntematon (Salonen 2016). Suomessa siihen sairastuu vuosittain noin 200 ihmistä. Tilastollisesti KLL on hieman yleisempi miehillä, kuin naisilla. Miehillä krooniseen lymfaattiseen leukemiaan sairastumisvaara 75 vuoden ikään mennessä on 0,3 %, kun taas naisilla 0,2 %. Tautia havaitaan yleisemmin iäkkäällä väestöllä. Suhteellinen elossaolo-osuus diagnosoiduista potilaista vuoden jälkeen on yli 90 % ja viiden vuoden jälkeen hieman alle 80 %. KLL eteneekin tavanomaisesti hitaasti. (NORDCAN 2016.)

Tehtyjen tutkimusten perusteella kroonista lymfaattista leukemiasairastavilla CD49d-positiivinen, raja-arvon ylittävä, ilmentymä lymfosyyteissä viittaa huonoon ennusteeseen (Nückel ym. 2009; Gattei ym. 2008; Shanafelt ym. 2008). Anti-CD49d on integriinin  $\alpha 4$ -ketjuun kohdistuva vasta-aine, joka ilmentyy vaihtelevasti kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa (Shanafelt ym. 2008:140). Helsingin ja Uudenmaan seudun laboratorioden (HUSLAB) Meilahden erikoishematologian laboratorion virtauscytometrian yksikössä on alustavasti otettu CD49d osaksi KLL potilaiden erotusdiagnostiseen virtauscytometrillä suoritettavaan immunofenotyypitykseen käytettyä lymfoproliferaalisten tautien diagnostista paneelia.

Virtauscytometrisesti pystytään jaottelemaan esimerkiksi verensolut granulaisuuden, tuma-sytoplasma suhteen, solujen koon sekä niissä ilmentyvien antigeenien perusteella. Solujen antigeenit pystytään havaitsemaan fluoresoivalla leimalla merkittyjen monoklonaalisten vasta-aineiden avulla, jotka tarttuvat vain spesifeihin antigeeneihin.

Opinnäytetyön tutkimus on luonteeltaan kvantitatiivinen, ja sen lähtökohtana on kehitystoiminta. Opinnäytetyössä verrataan arkistoitujen virtauscytometrialla diagnosoitujen KLL potilaiden CD49d-ilmentymiä verenkuvatietoihin, taudin syto- ja molekyylogeniikkaan sekä näytteiden esitiedoissa ilmeneviin hoitotietoihin. Tutkimusaineistoa kerättiin 106 potilasnäytteen osalta. Opinnäytetyössä pyrittiin selvittämään, voiko ja kannattaako CD49d-ilmentymää käyttää erotusdiagnostiikassa apuna KLL-potilaiden ennusteen arvioinnissa. Saatua tietoa käytetään HUSLAB:n virtauscytometrian laboratorion seuraavaa B-soluisten lymfoproliferaalisten tautien diagnostista paneelia suunnitellessa. Paneelia käytetään kroonisen lymfaattisen leukemian maligniteetin asteen arvioinnissa.

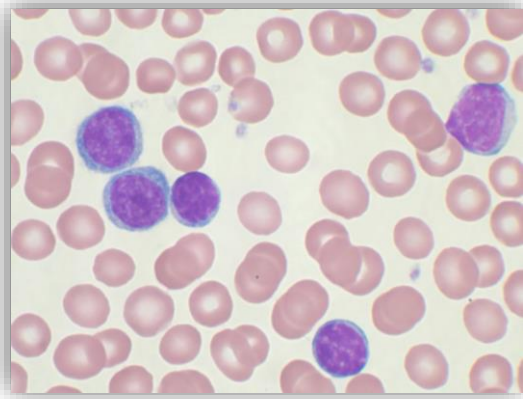
## 2 Krooninen lymfaattinen leukemia

Krooninen lymfaattinen leukemia (KLL) on yleisin leukemia aikuisten keskuudessa länsimaissa (Scarfò – Ferreri – Ghia 2016:170). Suomessa siihen sairastuu vuosittain noin 200 ihmistä. (NORDCAN 2016.) KLL todetaan usein sattuma löydöksenä oireettomalta potilaalta muuhun tarkoitukseen otettujen laboratoriokokeiden avulla. Veren kuvassa todetaan leukosytoosi, joka paljastuu lymfosytoosiksi. (Kuittinen – Remes 2015: 356–357.)

World Health Organisation (WHO) 2008 -luokituksen mukaan krooninen lymfaattinen leukemia on lymfoproliferatiivinen sairaus, jossa pyöreät B-lymfosyytit kerääntyvät ääreisverenkiertoon, luuytimeen ja imukudoselimiin (Scarfò ym. 2016: 170). KLL-solujen kertyminen elimistöön johtuu niiden vähentyneestä apoptoosista (solujen hajoaminen) eikä niinkään solujen proliferaatiosta (solujen jakautuminen) (Kuittinen – Remes 2015: 356–357).

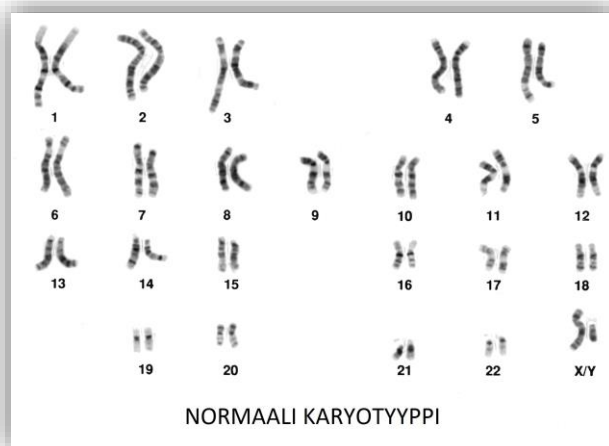
Krooninen lymfaattinen leukemia on B-lymfosyyttinen, etiologialtaan tuntematon verisairaus, joka etenee tavallisesti hitaasti. Sairastavien keskimääräinen elinaika on pitkä eikä tauti useinkaan lyhennä iäkkään potilaan odotettavissa olevaa elinikää. Kolmanneksella KLL-potilaista tauti ei vaadi hoitoa. Huonon ennusteen potilailla taudin kulku on kuitenkin aggressiivinen. Näiden potilaiden tunnistaminen sekä riskin mukaiset hoitoratkaisut ovat KLL hoidon haaste. (Salonen 2016.)

Taudin alkuvaiheessa havaitaan morfologisesti veressä sekä luuytimessä suuria määriä pieniä tai keskikokoisia kypsiä lymfosyyttejä (kuvio 1). Verestä tai luuytimen aspiraatiosta näytteestä tehdään myös virtausmittauksellinen immunofenotyyppitys, jonka avulla voidaan varmistaa diagnoosi ja B-lymfosyyttien klonalisuus immunoglobuliinien kevytketjuilmentymän avulla. Normaaliolotilanteessa kappa- ja lambda ketjuja ilmentäviä B-soluja on jotakuinkin yhtä paljon. KLL-potilaalla on toista ylimäärin, sillä kloonit tuottaa aina samaa kevyttä ketjua. Lisäksi KLL-solulla on ominainen normaaleista kypsistä B-soluista poikkeava immunofenotyyppi. (Kuittinen – Remes 2015: 356–357.)



Kuvio 1. Mikroskooppikuva KLL- potilaan veren MGG-värjätystä sivelyvalmisteesta. (©WikimediaCommons.)

Molekyyli- ja sytogeneettisten tutkimusten avulla voidaan määrittää krooniselle lymfaattiselle leukemialle ja myös muille syöville tyypillisiä solun perimäaineksen mutaatioita, joiden avulla voidaan arvioida potilaan ennustetta. Muutokset jaetaan määritysmenetelmien mukaan sytogeneettisiin ja molekyyligeneettisiin. Molekyyligenetiikan menetelmillä on mahdollista havaita pieniä perimän muutoksia, kuten esimerkiksi yhden nukleotidin vaihtumista DNA:ssa. Näitä pieniä perimän muutoksia voidaan osoittaa vain molekyyligenetiikan tutkimuksilla, kun taas yksinkertaisesti osoitettavissa oleva sytogeneettinen muutos, esimerkiksi puuttuva kromosomi on helpompi osoittaa sytogeneettisillä tutkimuksilla (kuvio 2). (Autio – Kairisto 2015: 101)



Kuvio 2. Ihmisen metafaasivaiheen normaali diploidi solun karyotyyppi (kromosomisto). Miehen näytteestä giemsavärjätty normaali kromosomisto. (Muokattu kuvasta ©WikimediaCommons.)



Syöpiin ja niiden alatyyppeihin liittyy useimmiten spesifisiä muutoksia. Nämä spesifit muutokset ovat yhteydessä taudin ennusteeseen ja siten ne voivat vaikuttaa myös hoitopäätöksiin. Geneettisillä poikkeavuuksilla on myös merkitystä hoidon seurantaan ja seurannan markkerin valinnassa, jolla voidaan monitoroida taudin etenemistä sekä jännostautia. (Autio – Kairisto 2015: 101-102.)

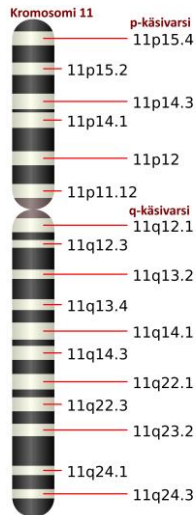
Tautisolujen kromosomimuutokset ja geenimutaatiot ilmaantuvat elämän aikana. Joitakin kromosomaalisia translokaatioita voidaan käyttää kroonisen lymfaattisen leukemian virtaussytometristen analyysien lisäksi erotusdiagnostiikassa muista lymfoproliferatiivisista taudeista. Esimerkiksi translokaatio (11;14), eli kromosomialueen muutos kromosomista 11 kromosomiin 14, yleensä esiintyy manttelisolulymfoomassa. (Hallek ym. 2008: 5447.)

Kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa luuytimen monikykyisestä hematopoieettisesta kantasolusta lähtöisin olevien B-lymfosyyttien kypsymisen aikana tapahtuu kolme merkittävää immunoglobuliinigeenin muutosprosessia. Geenin uudelleen järjestäytyminen luuytimessä, somaattinen hypermutaatio eli pistemutaatio sekä Immunoglobuliinin luokanvaihto imusolmukkeen itakeskuksessa. KLL voidaan jakaa kahteen eri pääluokkaan mutatoituneeseen ja ei-mutatoituneeseen tautiin sen mukaan onko soluissa tapahtunut immunoglobuliinigeenin raskaan ketjun vaihtuvan alueen (IGHV) somaattista mutaatiota. Ei-mutatoitunut tautimuoto on käyttäytymiseltään aggressiivisempi sekä ennusteeltaan huonompi kuin mutatoitunut. (Kuittinen – Remes 2015: 355.)

Krooniseen lymfaattiseen leukemiaan on yhdistetty myös muita geneettisiä mutaatioita, jotka voivat vaikuttaa taudin hoidossa käytettäviin lääkkeisiin sekä potilaan ennusteeseen. Kromosomialueen 13q deletio (puuttuma) on taudissa yleisin poikkeavuus. Tämä deletio on todettavissa 30–50 % kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavilla ja se on liitetty ainoana poikkeavuutena taudin suotuisaan ennusteeseen. Kromosomin 12 trisomia on todettavissa taas 15 % potilaista ja ennuste on hieman heikompi kuin normaalin karyotyypin omaavilla KLL-potilailla. (Suomen Hematologiyhdistys 2010; Van Dyke ym. 2016: 105; Hallek ym. 2008: 5447.)

Kromosomialueiden 11q-varren deletio (kuvio 3) on todettavissa 10-17 %:lla potilaista ja 17p-käsivarren deletio alle 10 % KLL-potilaista. Molemmat edellä mainituista mutaatioista ovat ennustetta huonontavia löydöksiä. Kromosomin 17p alueella olevat TP53-geenin mutaatiot heikentävät kroonisen lymfaattisen leukemian ennustetta. 11q- ja 17p-

mutaatiolöydöksiä tavataan useimmin hypermutaatiostatukseltaan ei mutatoituneessa tautimuodossa. (Suomen Hematologiyhdistys 2010; Van Dyke ym. 2016: 105-106; Hallek ym. 2008: 5447.) Noin 6 %:lla KLL potilaista todetaan kromosomin 6 pitkän haaran deleetio, Del(6q). Tämä mutaatio on todettu poikkeavuus useissa maligneissa taudeissa. (Dalsass ym. 2013: 10.)



Kuvio 3. Kromosomi 11. (Muokattu kuvasta ©WikimediaCommons.)

## 2.1 Diagnosointi

Kroonisen lymfaattisen leukemian tautistatuksen saaminen vaatii kroonista, yli kolme kuukautta kestänyttä, immunofenotyypiltään tyypillistä monoklonaalista B-lymfosytoosia. Tällöin perifeerisessä veressä on ainakin  $5 \times 10^9$  B-lymfosyyttiä/l. Näiden solujen klonalisuus on tarkistettava virtaussytometrisesti. (Hallek ym. 2008: 5446)

Mikäli B-lymfosytoosi on alle  $5 \times 10^9$ /l, tautia ei voida WHO:n luokituksen mukaan luokitella krooniseksi lymfaattiseksi leukemiaksi. Tällöin tautia kutsutaan monoklonaaliseksi B-lymfosytoosiksi, joka voidaan diagnosoida, jos potilaalla on taudille tyypilliset kliiniset oireet. Oireita ovat muun muassa sytopenia, splenomegalia ja hepatomegalia. (Hallek ym. 2008: 5446.)

Immunofenotyyppityksessä monoklonaaliset vasta-aineet voidaan jakaa CD-luokkiin (cluster of differentiation) tunnistamiensa antigeenien perusteella. Nämä monoklonaaliset fluorokromilla leimatut vasta-aineet kiinnittyvät vain tiettyihin solujen komponenttei-

hin. CD-luokkia tunnetaan jo yli 350. CD-luokat on jaettu ryhmiin esimerkiksi tunnistamiensa solujen, antigeenien, molekyylien ja reseptorien mukaan. (Siitonen – Penttilä 2015:140.)

Kroonisen lymfaattisen leukemian diagnoosi vaatii B-solu antigeenien CD19, CD20, CD23 ja T-solu antigeenin CD5 samanaikaisen ilmentymisen immunofenotyyppityksessä. KLL:lle luonteenomaista on pintaimmunoglobuliinien CD20 ja CD79b suhteellisen heikko ilmeneminen. (Hallek ym. 2008.) Solut ovat tyypillisesti CD200 positiivisia (Kuittinen – Remes 2015: 357). Solujen monoklonaalisuus voidaan todentaa kevyetketju restriktiolla (Ig-kappa tai Ig-lambda), suositellusti kahdella markkerilla CD19/kappa tai CD19/lambda. (Hallek ym. 2008: 5447.) KLL-solut eivät ilmennä CD10 antigeenia eivätkä tavallisesti FMC7:ää. Käytännössä näiden antigeenien tutkiminen riittää yleensä KLL:n tunnistamiseen ja erottamiseen muista B-lymfoproliferatiivisista taudeista (taulukko 1), joka on erittäin tärkeää. (Kuittinen – Remes 2015: 357.)

Taulukko 1. Kroonisten B-soluisten lymfoproliferaalisten tautien immunofenotyyppitys. Taulukossa esitetyt antigeeni-ilmentymät ovat kyseisissä taudeissa yleisimmin esiintyviä, mutta useissa antigeeni-ilmentymissä voi olla yksittäisissä tapauksissa poikkeamia. W tarkoittaa antigeenin heikkoa ilmentymistä. (Siitonen – Penttilä 2015: 146.)

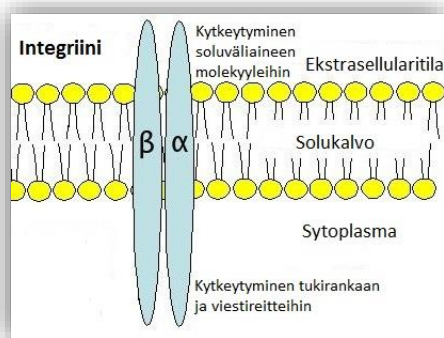
<i>Antigeeni</i>	CD 19	CD 20	CD 22	CD 23	CD 79b	Smlg	FMC7	CD 25	CD 11c	CD 103	CD 38	CD 138	CD 10	CD 5	CD 200
<i>KLL</i>	+	W	W	+	W	W	-	-	-/+ (+)	-	+/-	-	-	+	+
<i>Prolymfoosyytti leukemia</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-/+	-/+
<i>Karvasolu leukemia</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-/+ (+)	-	+
<i>Karvasolu leukemia (variantti)</i>	+	+	+	-	W	+	+	-	+/-	+/-		-	-	-	
<i>Plasmasolu leukemia SLVL</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-/+
	+	+/ (-)	+	-	+	+	+	-	-/+	-/ (+)	-	-	-	-	-/+
<i>Follikuraalinen lymfooma</i>	+	+	+	-	W	+	+/-	-	-	-	-	-	+	-	-/+
<i>Manttelisolulymfooma</i>	+	+	+	-	+	+	+/ (-)	-	-	-	-/+	-	-	+	-

## 2.2 CD49d-ilmentymä

CD49d, alpha 4-intergriini (VLA-4) on pintamolekyyli, joka vaikuttaa leukosyyttien ja stroomasolujen interaktioon luuytimessä sitoutumalla fibronektiiniin (Shanafelt ym. 2008: 538; Bulian ym. 2014: 897.). Integriinit ovat soluväliaine adheesion tärkeimpiä reseptorimolekyyliä (kuvio 4). Ne ovat oleellinen osa solujen kasvun säätelyä. Integriinireseptori muodostuu alfa- ja beta-alayksiköistä. Alfatyypin alayksikköjä tunnetaan 18 ja betatyypin alayksikköjä kahdeksan. Integriinit sitoutuvat solun ulkopuolisella osallaan soluväliaineen molekyyleihin. Sytoplasmisella osallaan integriinit kytkeytyvät solun viestireitteihin ja tukirankaan. Kytkösten kautta soluun välittyy informaatio kasvuun sekä jakautumiselle otollisista olosuhteista. (Lehti – Stenbäck 2012: 281.)

Kaikki normaalit B-solut ovat CD49d-positiivisia. Luuytimessä kehittyvän yhteyden strooma tekijöiden ja leukemiasolujen välillä on todettu edistävän KLL-solujen eloonjäämisessä. Tämä suojeleva teho välittyy osittain kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa B-solun pinnalla olevien integriinien (alpha4 beta1 integriini, VLA-4, CD49d) ja luuytimen stroomasoluissa ilmentyvien ligandien (VCAM1 ja fibronektiini) välillä. CD49d:llä on kriittinen rooli leukosyyttien kuljetuksessa, aktivaatiossa, eloonjäämisessä ja leukosyyttien sekä stroomasolujen interaktiossa luuytimessä, itukeskuksessa tai imukeräsissä sitoutumalla VCAM-1 ja fibronektiiniin. (Shanafelt ym. 2008: 538)

CD49d ilmentyy vaihtelevasti kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa ja tutkimuksissa on havaittu, että raja-arvon ylittävä CD49d-ilmeneminen (raja-arvo 30 % tai 45 %) viittaisi KLL potilaiden huonoon ennusteeseen. Kirjallisuuden mukaan kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavilla potilailla, joiden KLL-solut ovat CD49d-positiivisia, on lyhyempi hoitovapaa-aika ja elinaika kuin potilailla, joiden solut ovat negatiivisia. (Nückel ym. 2009; Gattei ym. 2008; Shanafelt ym. 2008; Bulian ym. 2014.)



Kuvio 4. Integriinin rakenne solun pinta-antigeenina. (Muokattu kuvasta ©WikimediaCommons.)

### 2.3 Kliiniset ennusteluokitukset

Kahden kliinisen ennuste luokituksen (Rai ja Binet) avulla on pyritty erottelamaan KLL potilaat eri kolmeen eri ryhmään spesifiejä parametrejä apuna käyttäen. Ennusteluokituksia käytetään apuna potilaiden eliniän ja taudin maligniteetin arvioinnissa. Opinnäytetyössä käytetään näitä luokitusten hemoglobiini ja trombosyyttiarvoja joiden korrelaatioita verrataan CD49d-ilmentymään. Luokituksista Euroopassa käytetään yleisesti Binetin kliinistä ennustusluokitusta. Rai -luokitus on taas yleisempi Yhdysvalloissa. (Rai ym. 1975; Binet ym. 1981; Shanafelt ym. 2009; Eichhorst 2015.)

#### 2.3.1 Binetin luokitus

Binetin luokituksessa KLL-potilaat jaetaan kolmeen eri ryhmään (taulukko 2) hemoglobiini- (Hb), trombosyyttiarvojen sekä suurentuneiden imusolmukealueiden määrän mukaan. (Eichhorst ym. 2015: 78–79.) Suurentuneiden imusolmukkeiden tulee tällöin olla suurempia kuin 1 cm halkaisijaltaan, tietyllä alueella olevat suurentuneet imusolmukkeet lasketaan yhdeksi alueeksi, vaikka useampikin imusolmuke olisi suurentunut (taulukko 3). (Hallek ym. 2008: 5447–5448.)

Taulukko 2. Binetin luokitus (Eichhorst ym. 2015: 79; Hallek ym. 2008: 5448).

Luokitus	Määritelmä	Mediaani elinaika
Binet A	Hb $\geq$ 100.0 g/l trombosyytit $\geq 100 \times 10^9/l$ <3 suurentunutta imusolmukealuetta	>10 vuotta
Binet B	Hb $\geq$ 100,0 g/l trombosyytit $\geq 100 \times 10^9/l$ $\geq 3$ suurentunutta imusolmukealuetta	>8 vuotta
Binet C	Hb < 100.0 g/l trombosyytit < $100 \times 10^9/l$	6,5 vuotta

Taulukko 3. Binetin luokituksen määritelmää koskevat alueet (Hallek ym. 2008: 5448).

## ALUEET

1.	Pää, kaula, Waldeyerin rengas mukaan lukien (lasketaan yhdeksi alueeksi, vaikka useampi, kuin yksi imusolmukeryhmä on suurentunut)
2.	Kainalo (molemmat kainalot lasketaan yhdeksi alueeksi)
3.	Nivustaipeet, mukaan lukien molemmat pinnalliset reiden alueet (molemmat nivustaipeet lasketaan yhdeksi alueeksi)
4.	Palpoitava perna
5.	Palpoitava maksa (kliinisesti suurentunut)

## 2.3.2 Rain muokattu luokitus

Rain muokatussa luokituksessa jaetaan kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavat potilaat alhaisen- (Rai 0), keskitason- (Rai I ja Rai II) sekä korkean riskin (Rai III ja Rai IV) omaaviin lymfosytoosiin, suurentuneiden imusolmukkeiden ja suurentuneiden sisäelinten mukaan (taulukko 4). (Eichhorst ym. 2015: 79.)

Taulukko 4. Rain luokitus (Eichhorst ym. 2015: 79).

<b>Luokitus</b>	<b>Määritelmä</b>	<b>Mediaani elinaika</b>
<b>Alhainen riski</b> <b>Rai 0</b>	Lymfosytoosi $>15 \times 10^9/l$	>10 vuotta
<b>Keskitason riski</b> <b>Rai I</b>	Lymfosytoosi Suurentuneita imusolmukkeita	>8 vuotta
<b>Rai II</b>	Lymfosytoosi Hepatomegalia ja/tai splenomegalia Suurentuneita imusolmukkeita tai ei	
<b>Korkea riski</b> <b>Rai III</b>	Lymfosytoosi Hb < 110g/l Suurentuneita imusolmukkeita tai ei Suurentuneita sisäelimiä tai ei	6,5 vuotta
<b>Rai IV</b>	Lymfosytoosi Trombosytoosi $<100 \times 10^9/l$ Suurentuneita imusolmukkeita tai ei Suurentuneita sisäelimiä tai ei	

## 2.4 Hoidon aloituksen indikaatiot

Yleisenä käytäntönä on seurata vastadiagnosoitujen, oireettomien kroonisen lymfaattisen leukemian varhaisvaiheen (Binet A, Rai 0) potilaita ilman hoidon aloitusta. Tutkimuksissa on osoitettu, että varhaisen vaiheen tautia sairastavien hoito kemoterapia lääkkeillä ei pidennä elinikää. Keskitason (Binet B, Rai I ja II) ja suuren riskin (Binet C, Rai III ja IV) omaavat potilaat taas yleensä hyötyvät hoidon aloituksesta. Joitakin potilaita, erityisesti Rai I, II ja Binet B-luokiteltuja potilaita voidaan seurata ilman hoitoa, kunnes saadaan todisteita taudin etenemisestä tai oireilusta. Etenevä tauti pitäisi olla hyvin dokumentoitu, jotta taudin protokollahoito voidaan aloittaa. Ainakin yksi (taulukko 5) kriteereistä tulee täyttyä, jotta kroonisen lymfaattisen leukemian hoito aloitetaan. (Hallek ym. 2008: 5448, 5450) Opinnäytetyössä verrataan korreloivatko hoitotiedot CD49d-positiivisen ilmentymän kanssa.

Taulukko 5. KLL –hoidon aloituksen IWCLL suosituksen mukaiset hoidon aloituksen indikaatiot (Hallek ym. 2008: 5450).

### **Aloituksen indikaatio**

1	Etenevä luuytimen toiminnan heikkeneminen paheneva anemia ja/tai trombositopenia luuydin infiltraation takia
2	Huomattava splenomegalia perna ainakin 6 cm kylkikaaren alapuolella etenevä tai oireinen splenomegalia
3	Huomattava lymfadenopatia imusolmukkeen läpimitta > 10 cm etenevä tai oireinen lymfadenopatia
4	Veren etenevä absoluuttinen lymfosytoosi yli 50 % nousu 2 kk aikana tai lymfosyyttien määrän kaksinkertaistuminen 6 kk aikana (ei tilanteissa, joissa alkuvaiheen lymfosyytit < 30 x10E9/l)
5	Huonosti kortikosteroidille tai muulle käypä hoidolle reagoiva AIHA tai ITP
6	Taudin yleisoireet tahaton vähintään 10 % painonlasku viimeisen 6 kk aikana merkittävänä väsymys (ECOG 2 tai huonompi) kuumetta vähintään 38.0 ainakin 2 viikon ajan ilman osoitusta infektiosta vähintään 1 kk ajan esiintynyt yö hikoilu

### 3 Virtaussytometria

#### 3.1 Virtaussytometri

Virtaussytometri (kuvio 5) koostuu nestejärjestelmästä, optisesta järjestelmästä ja elektronisesta järjestelmästä. Nestejärjestelmä liikuttaa tutkittavia partikkeleja, esimerkiksi soluja, nesteen avulla virtauskyvetin ja yksitellen lasersäteen läpi jätteastiaan. Canto II-virtaussytometrin optinen järjestelmä koostuu kolmesta laserista, jotka ohjataan prisman ja fokusointilinssin läpi näytepartikkeleihin. Näytepartikkeleista sironnut valo kerätään, suodatetaan ja muutetaan elektroniseksi signaaliksi detektoreilla. (BD Biosciences 2006: 106–110, 114)



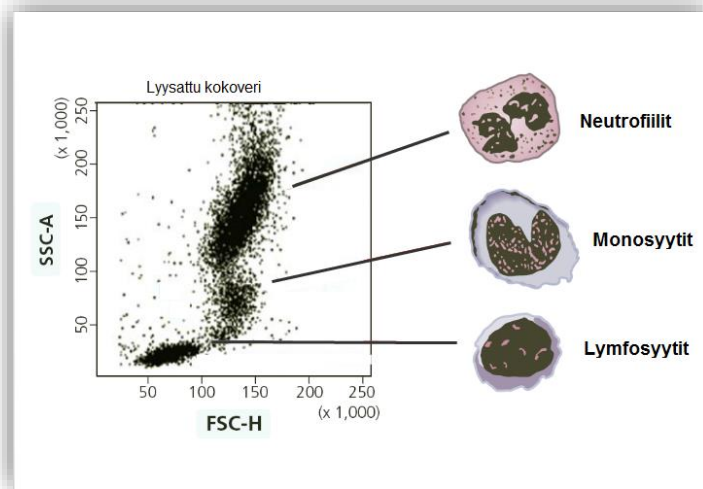
Kuvio 5. BD FACS Canto II virtaussytometri. (©BD Biosciences.)

#### 3.2 Periaate

Virtaussytometri rekisteröi laitteen lasersäteen läpi kulkevien yksittäisten natiivissa muodossa olevien solujen siroamaa ja lähettämää valoa. Valonsironnasta mitataan forward scatter (FSC) ja side scatter (SSC). Valo, joka siroaa suunnilleen samaan suuntaan kuin lasersäde kutsutaan forward scatter -nimellä. Side scatter -nimellä kutsutaan valoa, joka siroaa suurin piirtein kohtisuorassa lasersäteestä. FSC:n avulla saadaan tietoa solujen tai partikkeleiden kokoeroista ja SSC mittaa solujen tai partikkelien sisäistä kompleksisuutta, granularisuutta. (BD Biosciences 2006:110.) Mittauksessa saadaan siis tietää solun koko, granularisuus sekä tuman ja sytoplasman suhde. Veren valkosolut erottuvat



sirontaominaisuuksien avulla lymfosyyteiksi, monosyyteiksi ja granulosyyteiksi (kuvio 6). (Siitonen – Penttilä 2015:139.)



Kuvio 6. Kokoveren sirontakuvio. Valkosolujen luokittelu valonsironnan mukaan. (Muokattu kuvankaappauksesta opetusvideosta ©BD Biosciences.)

Virtausytometrisesti voidaan analysoida suuria solumääriä nopeasti. Tämä tekee menetelmästä kvantitatiivisen ja toistettavan. Diagnoosivaiheen näytteistä analysoidaan yleensä 20 000–100 000 solua ja jäännöstautianalyseissä useimmiten 500 000–3 000 000 solua. Tietojenkäsittelyjärjestelmän avulla tulokset muokataan havainnollistaviksi sirontakuvioksi, joiden avulla mahdolliset poikkeavat solut tunnistetaan. (Siitonen – Penttilä 2015:139.)

Virtausytometrisissä analyyseissä käytetään apuna fluoresoivia merkkiaineita (fluorokromeja), jotka tavanomaisesti on liitetty solujen komponentteja tunnistaviin monoklonaalisiin vasta-aineisiin. Käytettyjä fluorokromeja on useita. Useat samanaikaiset signaalit voidaan rekisteröidä erikseen johtamalla virittyneistä merkkiaineista lähtevä valo oikeanlaisten linssien ja suodinten avulla valonmonistinputkille. (Siitonen – Penttilä 2015: 139.)

### 3.3 Fluorokromit

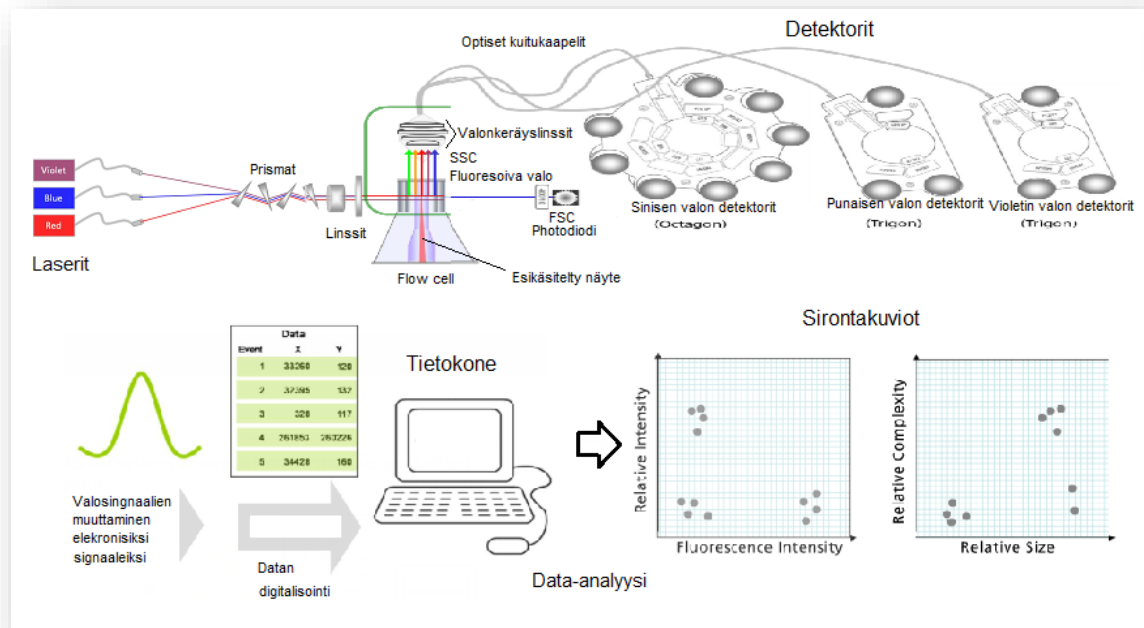
Fluorokromit ovat fluoresoivia merkkiaineita, jotka on kiinnitetty solujen komponentteja tunnistaviin monoklonaalisiin vasta-aineisiin. Kun fluorokromilla leimatut solut, joiden komponentit on merkitty osuvat lasersäteeseen kohdalle, väriaine absorboi fotonin (energiaa) ja virittyy korkeampaan energiatilaan. Fluorokromi emittoi matala energisemmän fotonin suurimmaksi osaksi valon muodossa palatessaan matalampaan energiatilaan. Tätä valon emissiota kutsutaan fluoresenssiksi. (BD Biosciences 2006:111.)

Esimerkiksi FITC-merkkiaine absorboi sinistä valoa (488 nm) ja emittoi vihreää valoa (530 nm). PerCP -merkkiaine taas absorboi sinistä valoa (488 nm) ja emittoi punaista valoa (675 nm). Nämä viritystilojen ja emission erot mahdollistavat monien fluorokromien virittymisen laserilla samaan aikaan. (BD Biosciences 2006:111.)

### 3.4 Immunofenotyyppitys

Immunofenotyyppitys on virtausytometrinen menetelmä, jossa solujen ilmentämien antigeenien perusteella voidaan määrittää niiden erilaistumislinja sekä erilaistumisen aste. Sen perustana ovat fluorokromi leimatut monoklonaaliset vasta-aineet, jotka voidaan jakaa CD-luokkiin (cluster of differentiation) tunnistamiensa antigeenien perusteella. Vasta-aineiden sitoutuminen solun eri antigeeneihin voidaan todeta muun muassa virtausytometrisellä analyysillä. (Siitonen – Penttilä 2015:140.)

Teknologian kehityksen myötä tullut monivärianalyysi on mahdollistanut useampien fluoresoivien merkkiaineiden analysoinnin tutkittavasta solussa samanaikaisesti. Mitä useampia fluorokromeja käytetään ja pystytään analysoimaan yhdessä solussa samanaikaisesti, sitä tarkemmin ja herkemmin pystytään virtausytometrisesti erottamaan normaaleista soluista leukeemiset solut (kuvio 7). (Siitonen – Penttilä 2015:140.)



Kuvio 7. Canto II -virtaussytometrin toimintaperiaate. Laserit kulkevat prismojen ohjaamina linssille ja siroavat näytteen soluista. Laite havaitsee detektoreillaan FSC- ja SSC-sironnan sekä fluoresenssileimasta lähtevän säteilyn, mitkä mitataan detektoreilla. Tämän jälkeen valon signaalit muutetaan elektronisiksi signaaleiksi, digitalisoidaan ja data-analyysin avulla saadaan sironnakuvio aikaiseksi. Sironnakuvioiden avulla voidaan määrittää muun muassa solun kypsyysaste ja solulinja. (Muokattu ©BD Biosciences-opetusvideosta otetuista kuvankaappauksista.)

### 3.5 Näytelaadut

Virtaussytometrisesti voidaan mitata esimerkiksi soluja, kromosomeja ja bakteereja. Kaikki näytelaadut tulee olla nestemäisessä muodossa ja käsitelty ennen analysointia. (BD Biosciences.) Alla esitellään näytelaadut, joiden viraussytometrisen immunofenotyyppityksen tuloksia opinnäytetyön aineisto on kerätty.

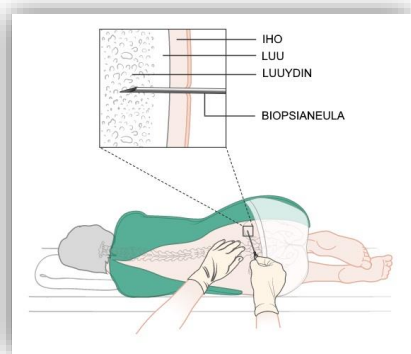
#### 3.5.1 Laskimoverinäyte

Laskimoverinäytteen ottaa laillistettu näytteenottaja eli bioanalytikko, laboratoriohoitaja, sairaanhoitaja tai lähihoitaja, jolla on näytteenotokoulutus. Laskimoverinäyte otetaan useimmiten kyynärtaipeen laskimosta, mutta muistakin laskimoista voi näytteen ottaa, esimerkiksi käden päältä. Virtaussytometrisesti analysoitava verinäyte (B-LyDiKLL) otetaan 5/3ml K2-EDTA-putkeen (etyleenidiamiinitetraetikkahappo). Näyte otetaan usein

suljetulla tyhjiömenetelmällä alipaineputkiin, jolloin putket täyttyvät tiettyyn merkkiin asti. Näytteen voidaan myös ottaa avotekniikalla, jossa näytteenottaja tiputtelee verta neulankannasta avattuun näyteputkeen käsineet kädessä. Tällöin tulee olla tarkkana, että näytettä on juuri tarpeeksi eikä se ole hyytynyt. Putket sekoitetaan välittömästi näytteenoton jälkeen kääntelemällä manuaalisesti tai laittamalla ne keinusekoittajaan. Näyte säilyy huoneenlämmössä 24 tuntia, joten se tulisi toimittaa mahdollisimman nopeasti tutkivaan laboratorioon. (HUSLAB 2016; Savolainen – Tienhaara 2015: 84–85.)

### 3.5.2 Luuydinnäyte

Luuytimen aspiraationäyte (imunäyte) otetaan joko rintalastasta toisen kylkiluuvälin korkeudelta (sternaalipunktio) tai suolituun takaharjanteesta (krista) (kuvio 8) (Savolainen – Tienhaara 2015:97–99). Rintalastasta näytettä otettaessa potilas on selällään ja kristasta näytettä otettaessa kyljellään (Salonen 2013). Näytteen ottokohta desinfioidaan huolellisesti, jonka jälkeen lääkäri puuduttaa punktiokohdan ihon ja luukalvon. (Savolainen – Tienhaara 2015:97–99.) Toimenpiteen suorittava lääkäri painaa näytteenotoneulan ihon ja luun kuorikerroksen läpi luuytimeen, josta hän imee ruiskulla luuydintä näytteeksi. Luuydintä imettäessä ruiskuun potilas tuntee usein alipaineesta johtuvan vihalaisun. Viratussytometrasta tutkimusta (Bm-LyDiKLL) varten tarvitaan 2ml luuydintä, jonka bioanalytiikko tai laboratoriohoitaja tyhjentää ruiskusta 9/10ml:n EDTA-vakuumputkeen. Näyte säilyy 24 tuntia ja tulee toimittaa tutkivaan laboratorioon mahdollisimman nopeasti. Näytteenoton yhteydessä tulee ottaa näyte myös verinäyte morfologiseen tutkimukseen. Näytteenoton jälkeen pistokohta peitetään puhtailla sidoksilla tai laastarilla. Potilaan tulee pitää iho kuivana ja puhtaana vähintään vuorokauden ajan. (Salonen 2013; HUSLAB 2015a).



Kuvio 8. Luuydinbiopsia kristasta. (Muokattu kuvasta ©WikimediaCommons.)

#### 4 Tutkimuksen tarkoitus, tavoite ja tutkimusongelmat

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää diagnosoitujen ja arkistoitujen potilasnäytteiden tuloksien avulla, viittaako CD49d-ilmentymä KLL-soluissa potilaiden huonoon ennusteesseen. Samalla tarkasteltiin CD49d-ilmentymän yhteyttä verenkuvatietoihin ja taudin syto- ja molekyyli-genetiikkaan sekä hoitotietoihin, mitkä voisivat mahdollisesti viitata huonoon ennusteesseen. Korrelaatiokertoimien avulla verrattiin keskenään näytteistä saatuja tietoja SPSS tilasto-ohjelman avulla, jotta voitiin määrittää, onko CD49d-ilmentymä todella taudin huonon ennusteen markkeri.

Tutkimuksella pyritään saamaan vastaus seuraaviin tutkimuskysymyksiin:

- Viittaako immenofenotyyppityksessä löydetty CD49d-ilmentymä KLL-soluissa huonoon ennusteesseen?
- Korreloiko potilaiden taudin syto- ja molekyyli-genetiikka CD49d-ilmentymän kanssa?
- Korreloivatko potilaiden hoitotiedot CD49d-ilmentymän kanssa?
- Korreloivatko verenkuvatiedot CD49d-ilmentymän kanssa?
- Onko potilaan iällä tai sukupuolella vaikutusta CD49d-ilmentymän korrelaatioon?

Tavoitteena oli saada luotettavaa tietoa immenofenotyyppityksessä havaitusta CD49d-ilmentymästä ja sen vaikutuksesta kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavien potilaiden hoitoennusteesseen ja elinikään. Tavoitteena oli myös saada selville kannattaako CD49d ottaa osaksi HUSLAB:n erikoishematologian virtausytometrisen määrittelyn seuraavaa B-solujen lymfoproliferaalisten tautien diagnostista paneelia. Opinnäytetyön tutkimuksessa hypoteesit asetettiin tutkimuskysymysten pohjalta (taulukko 6).

Taulukko 6. Opinnäytetyön tutkimukselle asetetut hypoteesit.

Nollahypoteesi ( $H_0$ )	Vastahypoteesi ( $H_1$ )
CD49d-ilmentymän ja hoitotietojen välillä ei ole riippuvuutta.	CD49d-ilmentymän ja hoitotietojen välillä on riippuvuutta.
Taudin molekyyli- ja sytogenetiikan ja CD49d-ilmentymän välillä ei ole riippuvuutta.	Taudin molekyyli- ja sytogenetiikan ja CD49d-ilmentymän välillä on riippuvuutta.
Verenkuvatietojen ja CD49d-ilmentymän välillä ei ole riippuvuutta.	Verenkuvatietojen ja CD49d-ilmentymän välillä on riippuvuutta.
CD49d-ilmentymän ja sukupuolen välillä ei ole riippuvuutta.	CD49d-ilmentymän ja sukupuolen välillä on riippuvuutta.
CD49d-ilmentymän ja iän välillä ei ole riippuvuutta.	CD49d-ilmentymän ja iän välillä on riippuvuutta.

## 5 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyön prosessi on kuvattu kuviossa 9. Tietotaustaa opinnäyteytöä varten haettiin englanninkielisistä tutkimusartikkeleista, kirjaston kirjoista sekä luotettavista verkko-osoitteista, jotka löytyivät LibGuides-sivujen kautta. Teoriatietoa kerättiin ja kirjattiin ylös opinnäytetyötä varten koko opinnäyteprosessin ajan. Tutkimuksen keskeistä käsitteistä on kerätty sanastoa (liite 1).



Kuvio 9. Opinnäytetyön työskentelyn eri vaiheet.

## 5.1 Aineisto

Aineisto kerättiin opinnäytetyössä harkinnanvaraisena otoksena toimeksiantajan antamien kriteerien mukaisesti. Näytteiden tuli olla kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavien veri- ja luuydinnäytteitä, joista HUSLAB:n tietokannoista löytyivät kaikki tarvittavat asiat (taulukko 7). Aineistosta kirjattiin toimeksiantajan määrittelemät asiat, joiden tilastollisen tutkimisen avulla voitiin vastata tutkimuskysymyksiin.

Taulukko 7. Aineisto

Nro.	Tietokannoista kirjataan
1.	Näytteenoton päivämäärä
2.	QPati numero (identifiointi)
3.	Näytelaatu (luuydin, veri)
4.	Sukupuoli (mies, nainen)
5.	Ikä
6.	Näytteenottopäivän (B-Leuk, B-Ly, B-Neut, B-Hb, B-Tromb)
7.	Lymfosyyttien osuus kaikista soluista (%)
8.	B-solujen osuus lymfosyyteistä (%)
9.	T-solujen osuus lymfosyyteistä (%)
10.	NK-solujen osuus lymfosyyteistä (%)
11.	T-solujen CD4/CD8 suhde
12.	Klonaalisten solujen osuus lymfosyyteistä
13.	Klonaalisten solujen absoluuttinen määrä verinäytteessä
14.	CD49d-positiivisten solujen osuus klonaalisista soluista
15.	Diagnoosi
16.	Seuranta näyte eli diagnoosi aiemmin tehty (kyllä/ei)
17.	Syto- ja molekyyli­genetiikka (ei tietoa/ yhteenveto kopioituna QPatista)
18.	Hoitotiedot (ei tietoa, hoidettu)

Mikäli näytteiden esitiedoissa oli mainittu hoidon aloituksesta tai hoidoista ylipäätään KLL:n suhteen, se merkittiin ylös. Näytteiden tuloksia kirjattiin Excel-tiedostoon aikaväliltä 15.4.2014–8.6.2015. Samalla kirjattiin ylös B-solu-taudit ja T-solu-taudit tukkimiehenkirjanpidolla, toimeksiantajan pyynnöstä. Luuydinnäytteistä saatiin verinäytteiden tulokset Multilabista samalta päivältä, kun luuydinnäyte oli otettu. Näytteet identifioitiin QPati numeron perusteella. Osa KLL näytteistä, jouduttiin jättämään tutkimuksesta pois, sillä kaikkia tarkasteltavia muuttujia ei näytteistä oltu analysoitu. Tutkimusaineistoa kerätessä läpi käytiin yhteensä 821 B-LyDiKLL ja Bm-LyDiKLL näyteiden tulkosia, joista B-solu tauti näytteitä oli 239 ja T-solutauti näytteitä oli 5 (taulukko 8).

Taulukko 8.

B-LyDiKLL ja Bm-LyDiKLL tutkimuksien B- ja T-solutaudit.

<b>Selitys</b>	<b>Lukumäärä</b>
<b>B-solutaudit</b>	239
<b>T-solutaudit</b>	5
<b>Muu tutkimus</b>	231

Sukupuoli ja ikä kirjattiin, jotta niiden vaikutus menetelmään voitiin poissulkea. Niiden avulla saatiin myös tietoa aineistosta. Veren leukosyytti-, lymfosyytti-, neutrofiili-, hemoglobiini- ja trombosyyttiarvojen avulla saatiin viitteitä edenneestä taudista. Esimerkiksi mikäli veren trombosyytti ja hemoglobiiniarvot olivat laskeneet, mikä on yhdistetty edenneempään tautiin. Lymfosyyttien alaluokkien tarkastelusta saatiin viitteitä potilaiden immuunipuutostiloista. Kääntynyt CD4 ja CD8 eli T-auttaja ja estäjä solujen suhde assosioidaan lyhyempään lymfosyyttien jakautumisaikaan ja lyhyempään aikaan diagnoosista hoitoon (Nunes ym. 2012). Syto- ja molekyyli-genetiikan avulla pystyttiin vertailemaan korrelaatioita eri ennusteen omaavien geneettisen muutoksen ja CD49d-ilmentymän kanssa. Hoitotietoja verrattiin myös CD49d-ilmentymään, minkä avulla voitiin katsoa hoitojen ja CD49d-ilmentymän korrelaatiota.

## 5.2 Aineiston analyysimenetelmät

Opinnäytetyön tutkimusaineisto tilastoitiin Word Excel-tiedostoon ja tulkittiin SPSS-tilasto-ohjelmaa apuna käyttäen (taulukko 9). Materiaalia käsiteltiin tunnuslukujen, frekvenssien ja riippuvuuksien avulla. Tilastoista saadut tiedot esitellään lukujen, taulukoiden ja kuvioiden muodossa. Aineiston analysoinnissa käytettiin suunniteltua vähemmän tilastollisia menetelmiä, sillä sen käsittely ei sitä vaatinut.

Taulukko 9.

Opinnäytetyössä käytetyt tilastolliset menetelmät.

<b>Tilastolliset menetelmät</b>
<u>Kuvailevat tunnusluvut</u> moodi, mediaani, aritmeettinen keskiarvo, keskihajonta, minimi, maksimi
<u>Frekvenssijakauma</u>
<u>Riippuvuuksien tutkiminen</u> korrelaatiokertoimet

Kuvailevat tunnusluvut ovat tilastollisen johtopäätösten perustana. Aineiston kuvaaminen tunnuslukujen avulla tulee suorittaa ennen muiden tilastollisten menetelmien käyttöä. Opinnäytetyössä käytettiin jakauman sijainnista tietoa antavia tunnuslukuja: moodi (mode), mediaani (median) ja aritmeettinen keskiarvo (mean). Jakauman muodosta taas kertovat keskihajonta (SD), minimi ja maksimi. Keskihajonnan avulla voidaan laskea



muuttujien välisiä korrelaatioita ja niiden sisäisiä ja välisiä variansseja. Moodin, mediaanin ja aritmeettisen keskiarvon avulla saadaan tietoa aineiston jakauman vinoudesta. (Heikkilä 2014: 161–166)

Yleensä kerätty aineisto ei sellaisenaan kelpaa kuvaamaan tutkittavaa asiaa, vaan otoksesta saatua tietoa jalostetaan ja tiivistetään, jotta johtopäätösten teko helpottuisi. Muuttujan frekvenssijakauma tulee tarkastella ennen muiden tilastollisten menetelmien käyttöä, sillä useat tilastomenetelmät edellyttävät aineiston noudattavan normaalijakaumaa, normaalijakauman noudattamisen pystytään myös tarkistamaan kuvailevien tunnuslukujen avulla. Frekvenssijakaumassa muuttujan vaihteluväli on jaettu eri luokkiin. Kuhunkin luokkaan tulevien havaintojen lukumäärät ilmoitetaan. (Tilastokeskus.)

Opinnäytetyössä riippuvuuksia tutkittiin korrelaatiokertoimien avulla. Tutkimuksessa käytettiin kahden muuttujan välisen lineaarisen yhteyden mittaamiseen parametrissa Pearsonin korrelaatiokerrointa  $r$ . Tällöin molemmat tutkittavat muuttujat ovat suhteasteikollisia. Mikäli aineiston normaalisuudesta on epävarmuutta, on parempi käyttää Spearmanin järjestyskorrelaatiokerrointa. Spearmanin järjestyskorrelaatiokerroin sopivat järjestys-, välimatka- ja suhteasteikollisille muuttujille. Tutkimusaineiston jakauma oli vino, joten korrelaatiot tarkistettiin vielä Spearmanin järjestyskorrelaatiokertoimella. Korrelaatiokertoimella saadaan tietää muuttujien riippuvuuksista, joiden avulla voitiin tutkia CD49d-ilmentymien korrelaatiota muihin aineiston määreisiin. (Heikkilä 2014: 192–193)

### 5.3 Aineiston analysointi

Tutkimuksen otos on vuosilta 2014 ja 2015 otettujen HUSLAB:n virtausytönetrian laboratorion arkistoiduista näytteiden tuloksista. Tutkimusaineisto koostui yhteensä 106 kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavien potilaiden näytteistä, joista 60 oli miesten näytteitä (56,6 %) ja 46 naisten (43,4 %) näytteitä. Luuydinnäytteitä otos sisälsi 31 (29,2 %) ja verinäytteitä 75 (70,8 %). Näytteet oli otettu iältään 40–90-vuotiaista ja heidän keski-ikänsä oli 68,75 vuotta. Seurantanäytteitä oli 26 kaikista tilastoiduista näytteistä.

Hoitotiedot koostuvat näytteiden esitiedoissa mainituista tiedoista. Suurimmassa osassa näytteitä (81 kpl) ei ollut merkitty minkäänlaisia potilaan hoitotietoihin liittyviä tietoja. Ai-

neiston 106 näytteestä 25 oli merkitty jotain tietoja hoidoista. Tiedot jaettiin kolmeen ryhmään: hoidon aloitusta pohditaan, kroonista lymfaattista leukemiaa on hoidettu ja tauti on pysynyt stabiilina ilman hoitoa (taulukko 10).

Taulukko 10.

Hoitotiedot. Frekvenssitaulukko.

	<i><b>Frekvenssi</b></i>	<i><b>Prosentti</b></i>	<i><b>Kumulatiivinen prosentti</b></i>
<b>Hoidon aloitusta pohditaan</b>	15	14,2	60
<b>Hoidettu KLL:ää</b>	6	5,7	84
<b>Pysynyt stabiilina ilman hoitoa</b>	4	3,8	100
<b>Yhteensä (hoitotiedot)</b>	25	23,6	
<b>Puutuu</b>	81	76,4	
<b>Yhteensä (kaikki tiedot)</b>	106	100	

Molekyyl- ja sytogeneettiset muutokset jaettiin eri luokkiin ennusteen mukaan (taulukko 11). Suurimmasta osasta näytteistä ei oltu pyydetty tai määritetty taudin geneettisiä muutoksia. Aineistossa hyvän ennusteen muutokseksi luokiteltiin kirjallisuuden avulla kromosomialueen 13q14 deleetio, jolla on ainoana muutoksena hyvä ennuste. Huonohkon ennusteen muutoksiksi luokiteltiin kromosomien 12,18 ja 19 trisomniat. Huonon ennusteen mutaatioiksi luokiteltiin muun muassa kromosomin 6 pitkän haaran deleetio, 17p13 alueen deleetio, p53-geenin deleetio ja deleetio alueella 11q22.

Taulukko 11.

Molekyyl- ja sytogenetiikka. Frekvenssitaulukko.

	<b>Frekvenssi</b>	<b>Prosentti</b>	<b>Kumulatiivinen prosentti</b>
<b>Ei tietoa</b>	59	55,7	55,7
<b>Ei todettu KLL:n liittyvää poikkeavaa löydöstä</b>	12	11,3	67,0
<b>Kromosomimuutos, jolla hyvä ennuste</b>	21	19,8	86,8
<b>Kromosomimuutos, jolla on huonohko ennuste</b>	2	1,9	88,7
<b>Kromosomimuutos, jolla huono ennuste</b>	11	10,4	99,1
<b>Kromosomimuutoksen vaikutus epäselvä</b>	1	0,9	100,0
<b>Yhteensä</b>	106	100,0	

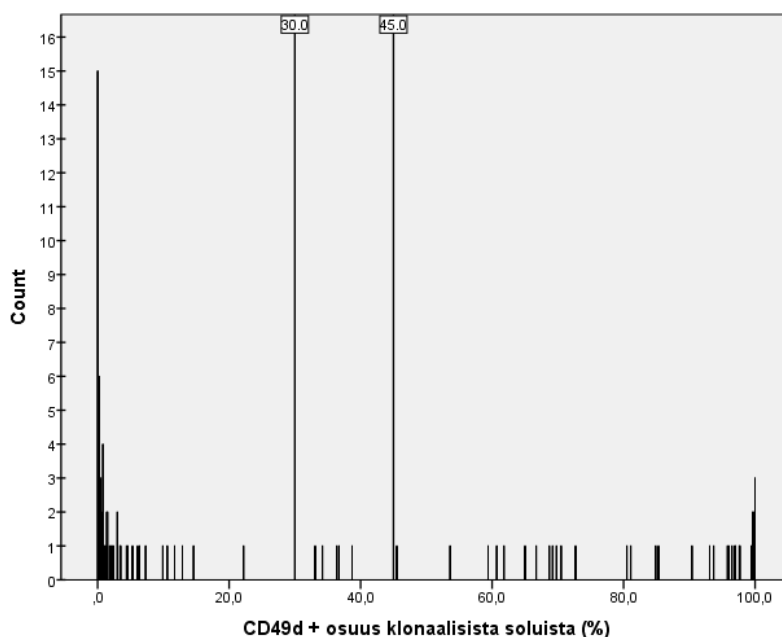
Aineiston aritmeettisen keskiarvon, mediaanin ja moodin vertailusta selviää, että suurin osa jakaumista on vinoja ja eivät noudata normaalijakaumaa. Ainoita suhteellisen hyvin normaalijakaumaa noudattavia parametreja otoksesta olivat ikä, veren neutrofiiliarvot, alle 100 g/l olevat hemoglobiiniarvot ja t-solujen CD4 ja CD8 suhde (taulukko 12).

Taulukko 12.

Kuvailevat tunnusluvut.

Parametri	N	Min	Max	Mean	Median	Mode	SD
<b>Ikä (näytteenotto hetkellä)</b>	106	40	90	68,75	69,00	77	10,82
<b>Näytteenottopäivän</b>							
<b>B-Leuk (10E9/l)</b>	106	4,2	283,4	42,57	21,50	17,9	49,30
<b>B-Leuk &gt;8,2 (10E9/l)</b>	99	8,6	283,4	45,08	24,00	17,9	50,07
<b>B-Ly (10E9/l)</b>	106	1,79	274,90	36,72	15,71	15,79	47,29
<b>B-Ly &gt;3,6 (10E9/l)</b>	102	4,46	274,90	38,05	16,93	4,46	47,72
<b>B-Neut (10E9/l)</b>	106	0,00	22,98	4,34	3,58	3,25	3,35
<b>B-Neut &gt;6,7 (10E9/l)</b>	12	6,74	22,98	11,64	86,00	86	5,05
<b>B-Hb (g/l)</b>	106	76	218	132,00	134,00	120	23,94
<b>B-Hb alle viitearvon</b>	38	76	131	108,87	111,50	120	16,00
<b>B-Hb &lt;110 (g/l)</b>	16	76	109	93,06	91,50	86	10,92
<b>B-Hb &lt;100 (g/l)</b>	11	76	99	87,09	86,00	86	7,08
<b>B-Tromb (10E9/l)</b>	106	23	552	191,89	186,50	256	77,67
<b>B-Tromb &lt;150 (10E9/l)</b>	32	23	149	112,84	118,50	85	34,30
<b>B-Tromb &lt;100 (10E9/l)</b>	10	23	96	71,70	85,50	85	28,03
<b>Lymfos. % osuus kaikista soluista</b>	106	9	98	70,12	73,50	83	17,74
<b>B-solujen % osuus lymfos.</b>	106	10	99	79,68	83,50	94	15,30
<b>T-solujen % osuus lymfos.</b>	106	1	72	16,17	13,00	5	12,67
<b>NK-solujen % osuus lymfos.</b>	106	0,0	17,0	3,74	2,00	1,0	3,30
<b>T-solujen CD4/CD8 suhde</b>	106	0,4	10,6	1,52	1,30	1,0	1,15
<b>Klonaalisten solujen osuus lymfosyyteistä %</b>	106	4,8	98,3	78,78	83,45	60,8	15,80
<b>Klonaalisten solujen Absoluuttinen määrä verinäytteessä</b>	75	0,1	161,7	20,08	8,50	6,2	29,72
<b>CD49d-positiivisten osuus klonaalisista soluista (%)</b>	106	0,0	100,0	30,03	3,20	0,0	39,04
<b>CD49d &gt;30 %</b>	39	33,1	100,0	77,63	84,90	100,0	22,42
<b>CD49d &gt;45 %</b>	34	45,5	100,0	83,77	91,75	100,0	16,56

Otoksesta CD49d-positiivisia 30 % raja-arvon ylittäviä tuloksia on 39 kappaletta 106 näytteestä ja CD49d-negatiivisia 67 kappaletta. CD49d-positiivisia 45 % raja-arvon ylittäviä näytteiden tuloksia taas on 34 kappaletta 106 näytteestä ja negatiivisia 72 kappaletta (kuvio 10). CD49d-ilmentymän jakauma on vino ja alhaisiin arvoihin painottuva.



Kuvio 10. Aineiston CD49d-positiivisten solujen osuus klonalisista soluista (%) jakauma pylväsdiagrammina esitettynä.

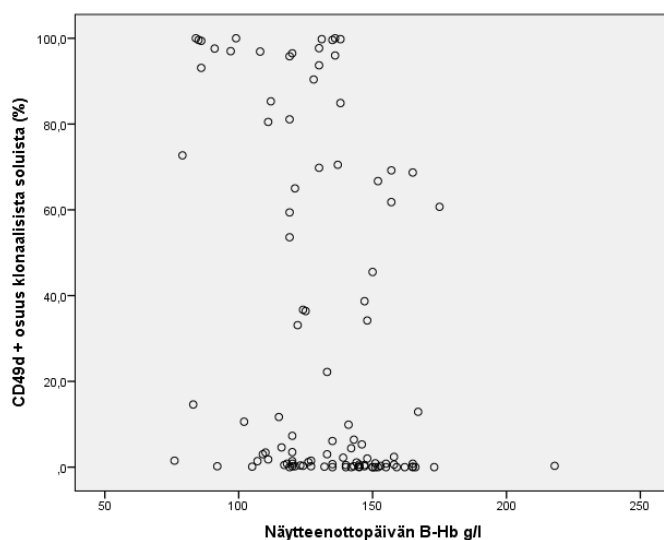
## 6 Tutkimuksen tulokset

Aineistosta testattiin kaksisuuntaisen Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla riippuvuus (liite 1), joka tarkistettiin kaksisuuntaisen Spearmanin järjestyskorrelaatiokertoimen määrityksellä, sillä suuri osa aineiston parametreista ei noudattanut normaalijakaumaa. Korrelaatioiden ja riippuvuuksien avulla pystyttiin testaamaan myös hypoteesit. Korrelaatiokertoimilla tehtyjen hypoteesien testauksen avulla saatiin vastaukset laadittuihin tutkimuskysymyksiin. CD49d-ilmentymän korrelaatiota muihin parametreihin verrattessa tarkasteltiin kokoaineiston ja aikaisempien tutkimusten määrittämien raja-arvojen (30 % ja 45 %) ylittävien tulosten osalta, jotta tulosten mahdollinen korrelaatio ei peittyisi CD49d-negatiivisten näytteiden tulosten joukkoon.

Molekyyli- ja sytogenetiikka sekä CD49d-ilmentymä klonalisissa soluissa osoittivat tilastollisesti merkitsevää riippuvuutta ( $p=0,008$ ) ja korreloivat myös vähäisesti Pearsonin korrelaatiokertoimen (korrelaatiokerroin 0,257) sekä Spearmanin korrelaatiokertoimen mukaan. Tietoja sytogenetiikan suhteen on vain 47 potilasnäytteen osalta, mikä saattoi osaltaan vaikuttaa taudin genetiikan ja CD49d-ilmentymän korrelaatioiden luotettavuuteen. Korrelaatio on merkityksettömän vähäinen, joka saattaa johtua tutkittavan aineiston

potilasnäytteiden tulosten vähydestä. Tällöin hypoteeseista vastahypoteesi astuu voimaan. CD49d-positiivisten klonaalisten B-solujen ja hoitotietojen p-arvo on 0,416, jolloin riippuvuutta ei ole. Tällöin hypoteeseista nollahypoteesi jää voimaan.

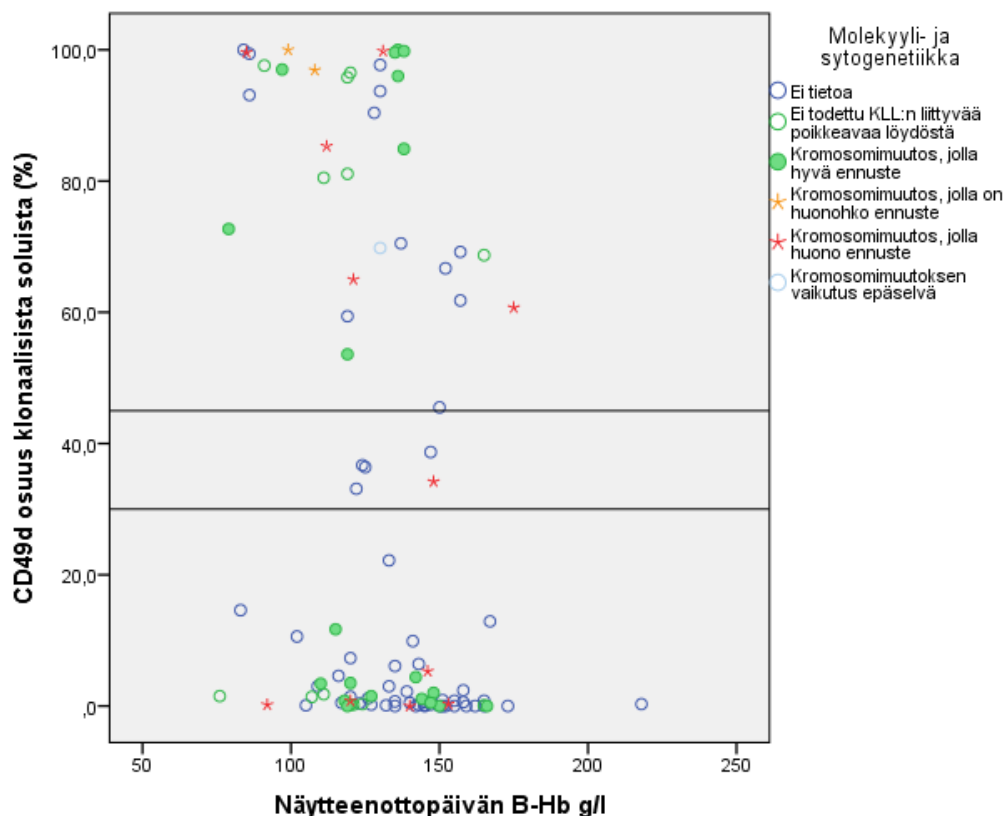
Verenkuvatiedoista trombosyytti ja hemoglobiiniarvoilla on CD49d-ilmentymän kanssa tilastollisesti erittäin merkitsevää riippuvuutta ( $p \leq 0,001$ ) ja todella lievää, ei merkityksellistä korrelaatiota (kuvio 11) veren trombosyytti (korrelaatio -0,307) ja hemoglobiiniarvoissa (korrelaatio -0,336). Tällöin hypoteeseista vastahypoteesi astuu voimaan. Sukupuolen ja CD49d-ilmentymän kanssa ei ole todettavissa ollenkaan riippuvuutta tai korrelaatiota. Tällöin hypoteeseista nollahypoteesi jää voimaan. Iän ja yli 45 % olevien CD49d-osuuksien kanssa on tilastollisesti melkein merkitsevää riippuvuutta ( $p=0,029$ ) ja lievää, mutta merkityksetöntä korrelaatiota (korrelaatio 0,375). Kyseinen riippuvuus ja korrelaatio saattavat johtua siitä, että 45 % ylittäviä CD49d-arvoja on tutkimusaineistossa vain 34 kappaletta. Tällöin hypoteeseista vastahypoteesi astuu voimaan.



Kuvio 11. Veren hemoglobiiniarvojen ja CD49d-ilmentymän jakauma, jossa voidaan nähdä, ettei korrelaatio ole merkittävää.

Kolmen riippuvuutta osoittavan parametrin avulla tarkasteltiin ja varmistettiin korrelaatio-kertoimien avulla havaittua merkityksetöntä korrelaatiota, tekemällä Scatter/Dot (kuvio 12). Kuviosta voidaan havaita, että huonon ennusteen kromosomimuutoksen omaavien potilaiden näytteistä löytyy myös CD49d-negatiivisia. Myös osalla hyvän ennusteen kromosomi muutoksen omaavista potilaista näytteiden CD49d-ilmentymät ovat positiivisia. Alhaisten hemoglobiiniarvojen on havaittu olevan huonomman ennusteen potilailla, joka

voidaan huomata Binetin sekä Rain luokituksista. Aineiston hemoglobiiniarvojen ja sytogenetiikan mukaan ei voida luokitella CD49d-ilmentymän viittaavan huonoon ennusteseen.



Kuvio 12. Aineiston jaottelu CD49d-ilmentymän, hemoglobiinin ja genetiikan perusteella.

## 7 Pohdinta

Opinnäytetyöprosessin tutkimuksessa saatiin selville, että CD49d-ilmentymä klonaalisisissa B-soluissa ei aineiston mukaan korreloi merkittävästi minkään tutkitun parametrin kanssa. Tutkimuksen perusteella ei voida sanoa tarkasti, onko CD49d-ilmentymällä vaikutusta kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavien potilaiden hoito- ja eliniän ennusteeseen. Toisaalta ainakin syto- ja molekyyli-genetiikan aineisto koostui vain 47 tuloksesta, koska kaikista potilaista ei oltu pyydetty ja tehty kyseisiä tutkimuksia. Myös hoitotietoja ei tiedetty kuin pienestä osasta aineiston potilasnäytteistä. Kattavampi tutkimus, jossa olisi enemmän näytteiden tuloksia huonon ennusteen potilaista olisi suositeltava, sillä kansainvälisissä tutkimuksissa on kuitenkin todettu positiivisen CD49d-ilmentymän

viittaavan potilaiden huonoon ennusteeseen, lyhyempään hoitovapaaseen aikaan ja lyhyempään elinaikaan. Myös pidempiaikainen tiettyjen potilaiden CD49d-ilmentymän ja hoitovälien tarkastelu luultavasti tuottaisi aikaisempia tutkimuksia tukevaa tietoa.

## 7.1 Luotettavuuden arviointi

Kokonaisluotettavuus koostuu validiteetista ja reliabiliteetista. Validiteetti kuvaa, miten hyvin ja missä määrin on onnistuttu mittaamaan mitä pitikin. Reliabiliteetti kuvaa kykyä tuottaa toistettavia tuloksia. Sisäinen reliabiliteetti voidaan todeta mittaamalla sama tilastoysikkö useamman kerran, mikäli mittaustulokset ovat samat mitaus on reliaabeli. Tutkimuksessa ulkoinen reliabiliteetti kuvaa mittausten toistettavuutta myös muissa tilanteissa ja tutkimuksissa. (Heikkilä 2014:177–178.)

Opinnäytetyötekijä noudatti tulosten dokumentoinnissa, tilastoinnissa ja analysoinnissa tarkkuutta ja huolellisuutta. Kaikki näytteet oli otettu ja analysoitu HUSLAB:n ohjeiden ja protokollan mukaisesti. Oletusarvona on, että opinnäytetyön tutkimuksen aineisto on luotettava näytteiden tulosten osalta.

Opinnäytetyön tutkimus on suhteellisen validi, sillä valittujen parametrien arvojen tarkastelun perusteella voitiin verrata klonaalisten B-solujen CD49d-ilmentymiä maligniin tautiin viittaaviin asioihin. Tällaisia asioita ovat muun muassa alhaiset trombosyyttiarvot ja hemoglobiiniarvot sekä huonon ennusteen mutaatiot, jotka on liitetty taudin ennusteeseen. Vaikka aineiston tarkastelusta ei saatu ihan täydellisesti edellisiä tutkimuksia vastaavaa tietoa, tutkimuksessa pystyttiin suhteellisen hyvin mittaamaan sitä mitä oli tarkoitus mitata niillä tiedoilla, mitä oli mahdollista käyttää. Opinnäytetyössä tutkittiin sisäinen reliabiliteetti analysoimalla tilastollisesti aineisto useamman kerran. Korrelaatiot testattiin Pearsonin korrelaatiokerrotoimen avulla sekä tarkistettiin Spearmanin järjestyskorrelaatiokerrotoimen avulla, jotta saatiin selville, vaikuttiko aineiston vinous Pearsonin korrelaatiokerrotimeen.

Työn otos ( $n=106$ ) on tarpeeksi suuri, jotta tuloksia voidaan tarkastella kokonaistasolla. (Heikkilä 2014:43,177–178). Otoksessa oli kuitenkin syto- ja molekyyli-genetiikan perusteella vain 11 kappaletta huonon ennusteen mutaation omaavien potilaiden näytteitä,

joita olisi mielestäni tarvinnut enemmän, jotta tutkimus olisi luotettavampi. Mikäli useammasta tutkimuksen otokseen valitusta näytteestä olisi pyydetty ja tehty molekyyli- ja sytogeneettiset tutkimukset, olisi tutkimuksessa voinut ilmetä merkittävämpää korrelaatiota geneettisten muutosten ja CD49d-ilmentymän kanssa.

## 7.2 Eettisyys

Tutkimusetiikalla tarkoitetaan kaikkia tutkimukseen ja tieteeseen liittyviä eettisiä näkökulmia ja arviointeja (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.). Tieteellinen tutkimus voi olla eettisesti hyväksyttävä, luotettava ja uskottava vain, jos se on suoritettu hyvän tieteellisen käytännön edellyttämällä tavalla (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2014). Eettisessä tutkimuksessa kunnioitetaan tutkittavien potilaiden ihmisarvoa ja oikeuksia (ETENE 2014: 15; Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2014).

Tässä opinnäytetyössä käytettiin sovellettuna eettisesti kestäviä tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmiä. Opinnäytetyön tutkimuksessa noudatettiin tiedeyhteisön tunnustamia toimintatapoja, joita ovat rehellisyys, yleinen huolellisuus ja tarkkuus tutkimustyössä, tulosten tallentamisessa ja esittämisessä sekä tutkimusten ja niiden tulosten arvioinnissa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.) Tutkimuslupa oli hankittu ennen potilastietojen haun alkua. Opinnäytetyössä on myös otettu huomioon tietosuojaa koskevat kysymykset. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2014.) Potilastiedot esitetään nimettömästi eivätkä ne tule tutkimuksen missään vaiheessa esille ja jäävät vain opinnäytetyön tekijän tietoon. Tietojen tarkastelua varten allekirjoitettiin salassapitosopimus, joka takaa potilaiden tietosuojan. Tutkimuksesta ei koidu potilaille mitään hyötyä tai haittaa ja hankittuja tietoja käytetään vain tässä tutkimuksessa. Ylimääräisiä näytteitä potilaista ei oleta. Opinnäytetyön tulokset julkaistaan nimettöminä. Raportissa potilastietoja tarkasteltiin kokonaisuutena, josta ei yksittäisiä potilaita voi mitenkään erottaa.



### 7.3 Tulosten hyödynnettävyys

Opinnäytetyn tutkimuksen tuloksia hyödynnetään HUSLAB:n Meilahden erikoishematologian virtausytometrian yksikössä uutta lymfoproliferatiivisten tautien diagnostista paneelia suunnitellessa. Tutkimustulosten perusteella määritellään mahdollisesti, kannattaako CD49d-proteiinia määrittää edelleen uudessa lymfoproliferatiivisten tautien diagnostisessa paneelissa. Tutkimustulosten perusteella CD49d-ilmentymä klonaalisisissa soluissa ei vaikuttaisi merkittävästi potilaiden ennusteeseen, on kuitenkin suositeltavaa tutkia asiaa vielä tarkemmin.

### 7.4 Prosessin arviointia

Opinnäytetyöprosessi sujui suunnitelman mukaisesti. Sain opinnäytetyön aiheen kesäkuussa 2016 HUSLAB:n Meilahden erikoishematologian laboratorion virtausytometrian yksiköstä. Aihe oli todella mielenkiintoinen, vaikka tilasto-ohjelmien ja tilastojen tulkitseminen jännitti hieman. Teorian taustatiedon hakemien oli mielestäni yllättävän helppoa ja sitä löytyi paljon. Opinnäytetyö prosessin aikana kehityinkin mielestäni tiedonhaussa, joka on ammatillisesti tärkeää, jotta pysyy kartalla uusista tutkimuksista. Uudet tutkimukset voivat vaikuttaa toimintatapoihin työelämässä. Suurin osa luotettavista kirjallisista lähteistä oli englanninkielisiä ja artikkelien ja muun materiaalin lukemiseen ja sisäistämiseen kului suhteellisen paljon aikaa. Kehityin myös ammatillisesti englannin kielen ymmärtämisessä ja tiedonhaussa, jotka tulevat auttamaan minua työelämässä.

Opinnäytetyön tutkimusaineiston keruussa HUSLAB:n tietokannoista piti olla todella tarkkana, joten tarkistin sen useamman kerran läpi. Keräsin tutkimusaineistoa tietokoneelta sekä paperiversioina olevista arkistoista. Kehityinkin työelämää varten tietokantojen käytössä ja tarkkuudessa. Myös tiedon haun suunnittelu tulee auttamaan ja valmistamaan minua työelämässä suunnitelmalliseen, järjestelmälliseen työskentelyyn.

SPSS-tilasto-ohjelman ja tilasto-ohjelmien käyttö on ollut aikaisemmin vähäistä. SPSS -tilasto-ohjelman käyttö osoittautui kuitenkin suhteellisen vaivattomaksi. Sain tilastotieteen opettajalta apua ongelmatilanteisiin. Opin käyttämään paremmin SPSS-tilasto-ohjelmaa ja tilastojen tulkinta onnistui mielestäni hyvin, vaikka aluksi se oli hieman hankalaa.

Tutkimusraportin kirjoitus luonnistui suhteellisen hyvin tutkimussuunnitelman tietoja ja-lostaen ja lisääillen. Kävin opinnäytetyöprosessin ohella *Tieteellisen kirjoittamisen ABC opinnäytetyössä* -jakson, josta sain paljon apua tieteellisen opinnäytetyötekstin kirjoittamiseen. Opin paljon lisää raporttien kirjoittamisesta opinnäytetyön teon ohella, jota pääsen mahdollisesti soveltamaan työelämän työohjeiden kirjoittamisessa. Kokonaisuudessaan opinnäytetyöprosessi oli kasvattava, opettava ja opin ammatillisesti paljon.

## Lähteet

Autio, Kirsi – Kairisto, Veli 2015. Verisyöpien syto- ja molekyyli­genetiikka. Teoksessa Porkka, Kimmo – Lassila, Riitta – Remes, Kari – Savolainen, Eeva-Riitta (toim.). Veritaudit. 4. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 101–138.

BD Biosciences. Training & E-learning. Overview. Opetusvideo <[http://static.bdbiosciences.com/training/itf/Module%202%20-%20Overview/presentation.html?\\_ga=1.33988513.1630871933.1484241417](http://static.bdbiosciences.com/training/itf/Module%202%20-%20Overview/presentation.html?_ga=1.33988513.1630871933.1484241417)>.

BD Biosciences 2006. BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual. Verkko-dokumentti. <<http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/Medizin/Pathologie/pdf/Canto-Manual.pdf>>. Luettu 12.1.2017.

Binet, J. L. – Auquier, A. – Dighiero, G. – Chastang, C. – Piguet, H. – Goasguen, J. – Vaugier, G. – Potron, G. – Colona, Y. P. – Oberlig, F. – Thomas, M. – Tchernia, G. – Jacquillat, C. – Boivin, P. – Lesty, C. – Duault, M. T. – Monconduit, M. – Eelabbes, S. – Gremy, F. 1981. A New Prognostic Classification of Chronic Lymphocytic Leukemia Derived from a Multivariate Survival Analysis. American Cancer Society 48 (1). 198–206.

Bulian, Pietro – Shanafelt, Tait – Fegan, Chris – Zucchetto, Antonella – Cro, Lilla – Nüchel, Holger – Baldini, Luca – Kurtova, Antonina – Ferrajoli, Alessandra – Burger, Jan – Gaidano, Gianluca – Del Poeta, Giovanni – Pepper, Chris – Rossi, Davide – Gattei, Valter 2014. CD49d Is the Strongest Flow Cytometry–Based Predictor of Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. Journal of clinical oncology 32 (9). 897–904.

Dalsass, A – Mestichelli, F – Ruggieri, M – Gaspari, P – Pezzoni, V – Vagnoni, D – Angelini, M – Angelini, S – Bigazzi, C – Falcioni, S – Troiani, E – Alesiani, F – Catarini, M – Attolico, I – Scortechini, I – Discepoli, G – Galieni, P 2013. 6q deletion detected by fluorescence in situ hybridization using bacterial artificial chromosome in chronic lymphocytic leukemia. European Journal of Hematology 91 (1). 10–19.

Eichhorst, B. – Robak, T. – Montserrat, E. – Ghia, P. – Hillmen, P. – Hallek, M. – Buske, C. 2015. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. Annals of Oncology 26 (5). 78–84.

ETENE = Valtakunnallinen sosiaali- ja terveysalan eettinen neuvottelukunta

ETENE 2014. Etiikkaa elämämme porteilla – periaatteita, kannanottoja ja näkemyksiä. Valtakunnallinen sosiaali- ja terveysalan eettinen neuvottelukunta 2010-2014. Valtakunnallinen sosiaali- ja terveysalan eettinen neuvottelulautakunta, Sosiaali- ja terveysministeriö. Helsinki: ETENE. Verkkodokumentti. <<http://etene.fi/documents/1429646/1555962/ETENE-julkaisuja+44+Etiikkaa+el%C3%A4m%C3%A4mme+porteilla+-+periaatteita%2C+kannanottoja+ja+n%C3%A4kemyksi%C3%A4.pdf/05ffc553-93d2-4474-99d9-4078b1d6bc1a>>. Luettu 4.10.2016.

Gattei, Valter – Bulian, Pietro – Ilaria Del Principe, Maria – Zucchetto, Antonella – Maurillo, Luca – Bucciano, Francesco – Bomben, Riccardo – Dal-Bo, Michele – Luciano,

Fabrizio – Rossi, Francesca – Degan, Massimo – Amadori, Sergio – Del Poeta, Giovanni 2008. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111 (2). 865–873.

Hallek, Michael – Cheson, Bruce – Catovsky, Daniel – Caligaris-Cappio, Federico – Dighiero, Guillaume – Döhner, Hartmut – Hillmen, Peter – Keating, Michael – Montserrat, Emili – Rai, Kanti – Kipps, Thomas 2008. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111 (12). 5446–5456.

Heikkilä, Tarja 2014. Tilastollinen tutkimus. 9. uudistettu painos. Helsinki: EDITA.

HUSLAB = Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriot

HUSLAB 2016. Immunofenotyyppitys, krooninen lymfoproliferatiivinen tauti, verestä. B-LyDiKLL. Tutkimusohjekirja. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirja/8356.html>>. Luettu 1.8.2016.

HUSLAB 2015a. Immunofenotyyppitys, krooninen lymfoproliferatiivinen tauti, luuytimestä. Bm-LyDiKLL. Tutkimusohjekirja. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirja/8357.html>>. Luettu 1.8.2016.

HUSLAB 2015b. Perusverenkuva, leukosyyttien erittelylaskenta, koneellinen, verestä. B-PVK+TKD. Tutkimusohjekirja. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirja/2475.html>>. Luettu 8.1.2017.

Lehti, Veli-Pekka – Stenbäck, Frej 2012. Syöpäsolun riippumattomuus kasvua rajoittavista tekijöistä. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.). *Patologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 279–282.

NORDCAN 2016. Association of the Nordic Cancer Registries. Leukemia, lymfaattinen krooninen. Verkkodokumentti. <<http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/Stats-Fact.asp?cancer=430&country=246>> Luettu 10.1.2017.

Nunes, Claudia – Wong, Ryan – Mason, Malcolm – Fegan, Chris – Man, Stephen – Pepper, Chris 2012. Expansion of a CD8+PD-1+ Replicative Senescence Phenotype in Early Stage CLL Patients Is Associated with Inverted CD4:CD8 Ratios and Disease Progression. *Clinical Cancer Research* 18(3). 678–687.

Nückel, Holger – Switala, Magdalena – Collins, Crista – Sellman, Luger – Grosse-Wilde, Hans – Dührsen, Ulrich – Rebmann, Vera 2009. High CD49d protein and mRNA expression predicts poor outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Immunology* 131. 472–480.

Rai, Kanti – Sawitsky, Artur – Cronkite, Eugene – Chanana, Arjun – Levy, Robert – Pasternack, Bernard 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46 (2). 219–234.

Salonen, Jonna 2016. KLL eli krooninen lymfaattinen leukemia. Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00821](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00821)>. Luettu 9.12.2016.

Salonen, Jonna 2013. Luuydinäyte. Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk01142](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01142)>. Luettu 20.12.2016.

Savolainen, Eeva-Riitta – Tienhaara, Anri 2015. Verinäytteet ja morfologiset tutkimukset. Teoksessa Porkka, Kimmo – Lassila, Riitta – Remes, Kari – Savolainen, Eeva-Riitta (toim.). Veritaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 84–100.

Scarfò, Lydia – Ferreri, Andrés – Ghia, Paolo 2016. Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 104.169–182.

Shanafelt, Tait – Geyer, Susan – Bone, Nancy – Tschumper, Renee – Witzig, Tom – Nowakowski, Greg – Zent, Clive – Call, Tim – LaPlant, Betsy – Dewald, Gordon – Jelinek, Diane – Kay, Neil 2008. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *British Journal of Haematology* 140. 537–546.

Shanafelt, Tait – Jenkins, Greg – Call, Timothy – Zent, Clive – Slager, Susan – Bowen, Deborah – Schwager, Susan – Hanson, Curtis – Jelinek, Diane – Kay, Neil 2009. Validation of a New Prognostic Index for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Cancer* 115 (2). 363–372.

Siitonen, Sanna – Penttilä Tarja-Leena 2015. Pahanlaatuisten veritautien immunofenotyyppitys. Teoksessa Porkka, Kimmo – Lassila, Riitta – Remes, Kari – Savolainen, Eeva-Riitta (toim.). Veritaudit. 4. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 139–151.

Suomen Hematologiayhdistys 2010. KLL. Verkkodokumentti. <<http://www.hematology.fi/fi/book/export/html/5148>>. Luettu 5.12.2016.

Tilastokeskus. Käsitteet. Frekvenssijakauma. Verkkodokumentti. <<http://www.stat.fi/meta/kas/frekvenssi.html>>. Luettu 15.11.2016.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2014. Hyvä tieteellinen käytäntö. Verkkodokumentti. <<http://www.tenk.fi/fi/htk-ohje/hyva-tieteellinen-kaytanto>>. Luettu 4.10.2016

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkaus-epäilyjen käsitteleminen Suomessa. 4–40. Verkkodokumentti. <[http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK\\_ohje\\_2012.pdf](http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf)>. Luettu 3.3.2017.

Van Dyke, Daniel – Werner, Lillian – Rassenti, Laura – Neuberg, Donna – Ghia, Emanuella – Heerema, Nyla – Dal Cin, Paola – Dell Aquila, Marie – Sreekantaiah, Chandrika – Greaves, Andrew – Kipps, Thomas – Kay, Neil 2016. The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *British Journal of Haematology* 173. 105–113

## Sanasto

**Adheesio:** Kahden aineen välinen vetovoima.

**Apotoosi:** Hallittu solukuolema.

**B-Leuk:** Veren leukosyytit, valkosolut.

**B-Ly:** Veren lymfosyytit.

**B-Neut:** Veren neutofiilit.

**B-Hb:** Veren hemoglobiini.

**B-LyDiKLL:** veren immunofenotyyppitys, krooninen lymfoproliferaalinen tauti.

**B-Tromb:** Veren trombosyytit, verihiutaleet.

**B-Morfo:** Veren morfologinen tutkimus.

**Bm-LyDiKLL:** luuytimen immunofenotyyppitys, krooninen lymfoproliferaalinen tauti.

**CD49d-proteiini:** anti-CD49d (vasta-aineen) tunnistamaa alpha 4-intergriini (reseptori).

**Deleetio:** Kromosomin osan puuttuma.

**Etiologia:** Taudin syy.

**Fibronuktiini:** Soluväliaineen proteiini.

**Fluorokromi:** Fluoresoiva merkkiaine.

**Integriini:** Solun reseptorimolekyyli.

**Interaktio:** Vuorovaikutus.

**Leukosytoosi:** Viitearvoihin verrattuna korkea leukosyyttiarvo.

**Ligandi:** Reseptoriin sitoutuva molekyyli.

**Lymfosytoosi:** Viitearvoihin verrattuna korkea lymfosyyttiarvo.

**Molekyyliigenetiikka:** Perimäaineksen muutoksien tutkiminen erilaisia epäsuoria menetelmiä käyttäen. Menetelmillä voidaan havaita pieniäkin muutoksia DNA:ssa.

**Monoklonaalinen vasta-aine:** Spesifi vasta-aine, joka tarttuu vain tiettyihin solun komponentteihin.

**Mutaatio:** Muutos solun perimäaineksessa.

**Parametri:** Tutkittava yksikkö.

**Proliferaatio:** Solujen jakautuminen.

**Stroomasolut:** Tukikudossolut.

**Sytogenetiikka:** Sytogeneettiset menetelmät tunnistavat perimän uudelleenjärjestymiä, mitkä perustuvat jakautumisvaiheessa olevien solujen mikroskopiaan ja kuvantamiseen.

**Translokaatio:** Perimäaineksen siirtyminen.

# Tutkimusaineiston Pearsonin korrelaatiokertoimet

		CD49d-positiivisten osuus klonaalisisista soluista (%)	CD49d >30 %	CD49d >45 %
<b>Näyte</b>	Pearson Correlation	-,249**	-0,274	-0,246
	Sig. (2-tailed)	0,010	0,091	0,161
	N	106	39	34
<b>Sukupuoli</b>	Pearson Correlation	-0,056	0,048	0,255
	Sig. (2-tailed)	0,565	0,770	0,145
	N	106	39	34
<b>Ikä (näytteenotto hetkellä)</b>	Pearson Correlation	0,147	0,243	0,375*
	Sig. (2-tailed)	0,133	0,136	0,029
	N	106	39	34
Näytteenottopäivän				
<b>B-Leuk (10E9/l)</b>	Pearson Correlation	0,156	0,273	0,156
	Sig. (2-tailed)	0,110	0,092	0,380
	N	106	39	34
<b>B-Leuk &gt;8,2(10E9/l)</b>	Pearson Correlation	0,175	0,302	0,210
	Sig. (2-tailed)	0,084	0,073	0,248
	N	99	36	32
<b>B-Ly (10E9/l)</b>	Pearson Correlation	0,159	0,263	0,146
	Sig. (2-tailed)	0,104	0,106	0,409
	N	106	39	34
<b>B-Ly &gt;3,6 (10E9/l)</b>	Pearson Correlation	0,161	0,280	0,162
	Sig. (2-tailed)	0,106	0,089	0,368
	N	102	38	33
<b>B-Neut (10E9/l)</b>	Pearson Correlation	-0,043	0,173	0,170
	Sig. (2-tailed)	0,659	0,291	0,337
	N	106	39	34
<b>B-Neut &gt;6,7(10E9/l)</b>	Pearson Correlation	-0,221	0,417	0,417
	Sig. (2-tailed)	0,490	0,485	0,485
	N	12	5	5
<b>B-Hb g/l</b>	Pearson Correlation	-0,336**	-0,431**	-0,487**
	Sig. (2-tailed)	0,000	0,006	0,003
	N	106	39	34
<b>B-Hb alle viitearvojen</b>	Pearson Correlation	-0,211	-0,437	-0,335
	Sig. (2-tailed)	0,204	0,054	0,175
	N	38	20	18
<b>B-Hb &lt;110 (g/l)</b>	Pearson Correlation	-0,244	0,437	0,437
	Sig. (2-tailed)	0,362	0,240	0,240

	N	16	9	9
<b>B-Hb &lt;100 (g/l)</b>	Pearson Correlation	0,378	0,550	0,550
	Sig. (2-tailed)	0,251	0,158	0,158
	N	11	8	8
<b>B-Tromb (10E9/l)</b>	Pearson Correlation	-0,307**	-0,167	0,040
	Sig. (2-tailed)	0,001	0,308	0,823
	N	106	39	34
<b>B-Tromb &lt;150 (10E9/l)</b>	Pearson Correlation	-0,099	-0,043	-0,043
	Sig. (2-tailed)	0,590	0,861	0,861
	N	32	19	19
<b>B-Tromb &lt;100(10E9/l)</b>	Pearson Correlation	0,274	0,461	0,461
	Sig. (2-tailed)	0,444	0,298	0,298
	N	10	7	7
<b>Lymfos. %-osuus kaikista soluista</b>	Pearson Correlation	0,216*	0,285	0,110
	Sig. (2-tailed)	0,026	0,079	0,535
	N	106	39	34
<b>B-solujen %-osuus lymfos.</b>	Pearson Correlation	0,153	0,352*	0,179
	Sig. (2-tailed)	0,118	0,028	0,311
	N	106	39	34
<b>T-solujen %-osuus lymfos.</b>	Pearson Correlation	-0,128	-0,321*	-0,178
	Sig. (2-tailed)	0,191	0,047	0,314
	N	106	39	34
<b>NK-solujen %-osuus lymfos.</b>	Pearson Correlation	-0,168	-0,260	-0,024
	Sig. (2-tailed)	0,085	0,109	0,893
	N	106	39	34
<b>T-solujen CD4/CD8 suhde</b>	Pearson Correlation	-0,070	0,254	0,159
	Sig. (2-tailed)	0,478	0,119	0,369
	N	106	39	34
<b>Klonaalisten solujen osuus lymfos. %</b>	Pearson Correlation	0,145	0,360*	0,188
	Sig. (2-tailed)	0,137	0,025	0,287
	N	106	39	34
<b>Klonaalisten solujen abs. määrä verinäyte</b>	Pearson Correlation	0,050	0,234	0,131
	Sig. (2-tailed)	0,672	0,283	0,593
	N	75	23	19
<b>Diagnoosi</b>	Pearson Correlation	0,042	-0,102	-0,182
	Sig. (2-tailed)	0,669	0,536	0,302
	N	106	39	34
<b>Seuranta (kyllä/ei)</b>	Pearson Correlation	0,246*	0,244	0,054
	Sig. (2-tailed)	0,011	0,135	0,760
	N	106	39	34
<b>Sytogenetiikka</b>	Pearson Correlation	0,257**	0,165	0,082
	Sig. (2-tailed)	0,008	0,315	0,647



	N	106	39	34
<b>Sytogenetiikka (luokittelu ennusteen mukaan)</b>	Pearson Correlation	0,065	-0,293	-0,178
	Sig. (2-tailed)	0,662	0,175	0,428
	N	47	23	22
<b>Hoitotiedot</b>	Pearson Correlation	0,170	0,356	0,356
	Sig. (2-tailed)	0,416	0,256	0,256
	N	25	12	12

\*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).